

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

Embryotoxische Wirkung von Cyclophosphamid
in Kombination mit Azathioprin.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Waltraude Kochs aus Bad Freienwalde

1972



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550817_0011

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

Embryotoxische Wirkung von Cyclophosphamid
in Kombination mit Azathioprin.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Waltraude Kochs aus Bad Freienwalde

Referent: Professor Dr. med. Diether N e u b e r t

Korreferent: Professor Dr. med. Hans-Joachim M e r k e r



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am 27. März 1972

ÜBERSICHT

1. Einleitung und Zielsetzung
2. Kurze Charakterisierung der benutzten Pharmaka
 - 2.1. Einteilung von Cytostatica nach ihrem Wirkungsmechanismus
 - 2.2. Cyclophosphamid
 - 2.3. Azathioprin
 - 2.4. Allgemeine Vorbemerkungen zum Problem der Medikamenten-Kombination
3. Methodik und Versuchsdurchführung
 - 3.1. Haltung und Paarung der Versuchstiere
 - 3.2. Behandlung der Versuchstiere mit Cyclophosphamid und Azathioprin
 - 3.2.0. Applikationszeit und Dosis der verabreichten Cytostatica
 - 3.2.1. Behandlung mit Cyclophosphamid
 - 3.2.2. Behandlung mit Azathioprin
 - 3.2.3. Behandlung mit Kombinationen von Cyclophosphamid und Azathioprin
 - 3.2.4. Behandlung der Kontrolltiere
 - 3.3. Methoden zur Auswertung der Versuchsergebnisse
 - 3.3.1. Sectio der Muttertiere
 - 3.3.2. Präparierung und Aufhellung der Embryonen
4. Ergebnisse und Diskussion
 - 4.1. Embryo-Mortalität
 - 4.2. Durchschnittsgewicht der Feten
 - 4.3. Untersuchungen der Skelettentwicklung und -verknöcherung
 - 4.4. Analyse der Wirkungen einer Kombination von Endoxan und Imuran
5. Zusammenfassung
6. Literatur

1. Einleitung und Zielsetzung

=====

Die zunehmende Anwendung cytostatischer Pharmaka bei der Therapie bestimmter Neoplasien und bei einer Immuno-suppressiven Therapie wirft neben Fragen der eigentlichen therapeutischen Wirkung auch Probleme auf, die mit einer Einschränkung der Indikation oder sogar mit Kontraindikationen verbunden sind. Da bisweilen auch bei Patientinnen im konzeptionsfähigen Alter die Notwendigkeit besteht, diese Medikamente zu applizieren und da - besonders in den Frühstadien - eine Schwangerschaft nicht mit Sicherheit ausgeschlossen wird, sind eventuelle Nebenwirkungen auf die Nachkommen von besonderem Interesse.

Während sich eine ganze Reihe von Untersuchern mit embryotoxischen Wirkungen einzelner Pharmaka beschäftigt hat, liegen nur wenige Ergebnisse von Untersuchungen vor, in denen Kombinationen von Pharmaka auf embryotoxische Wirkungen ausgewertet wurden. Aufgabe der vorliegenden Arbeit sollte es sein, Anhaltspunkte darüber zu erhalten, ob embryotoxische und teratogene Wirkungen cytostatischer Präparate - speziell von Cyclophosphamid und Azathioprin - bei kombinierter Anwendung verändert - verstärkt oder vielleicht sogar abgeschwächt - werden können. Bei dem ausgeprägten Arzneimittelkonsum - und auch Abusus - spielt auch die toxische Wirkung von Pharmakon-Kombinationen eine zunehmende Rolle.

Als embryotoxische Wirkungen wurden in dieser Arbeit ausgewertet Retardierungen während der Foetalentwicklung, embryofetale Effekte und besonders Veränderungen der Entwicklung des Skelettes von Rattenembryonen.

Diese Arbeit ist ein Teil einer gemeinsamen Untersuchungsreihe, die zusammen mit Werner Kloppenburg (siehe Dissertation Kloppenburg) durchgeführt wurde. Die Werte für die Kontrollen und die

Daten nach Gabe von Cyclophosphamid allein sind gleichzeitig auch Bestandteil der Dissertation Kloppenburg.

2. Kurze Charakterisierung der benutzten Pharmaka

2.1. Einteilung von Cytostatica nach ihrem Wirkungsmechanismus

"Cytostatica" ist ein pharmakologisch-therapeutischer Begriff und keine Bezeichnung für eine chemisch einheitliche Stoffgruppe. In Tabelle 1 ist eine Einteilung der Cytostatica wiedergegeben:

1. DNA-komplexierende Pharmaka
2. Alkylierende Substanzen
3. Antimetaboliten
 - a. Purinantagonisten
 - b. Pyrimidinantagonisten
 - c. Folsäureantagonisten
4. Mitosehemstoffe
5. Weitere Substanzen mit cytostatischer Wirkung
wie z.B. Natulan und L-Asparaginase

Tabelle 1: Einteilung der Cytostatika nach NEUBERT 1968

Die für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente benutzten Cytostatica gehören der Gruppe alkylierender Substanzen (Cyclophosphamid) sowie der Gruppe Antimetaboliten, Purinantagonisten, (Azathioprin) an. Beide Substanzen werden therapeutisch vergleichsweise viel benutzt.

2.2. Cyclophosphamid

Cyclophosphamid (N,N-Bis-(2-chloräthyl)-N,O-propylenphosphorsäureester-diamid) gehört zur Gruppe der alkylierenden Substan-

zen vom Lost-Typ. Solche Pharmaka hemmen - wie viele andere cytostatische Substanzen auch - das Wachstum proliferierender Gewebe wie zum Beispiel Neoplasmen, blutbildende Gewebe, Schleimhautepithelien, Haarfollikel und vor allem auch das von embryonalem Gewebe. Häufig wird von diesen Substanzen auch die Immun-Lage des Organismus durch Hemmung der Antikörperbildung beeinträchtigt.

Im Gegensatz zu einer Reihe anderer alkylierender Substanzen muß Cyclophosphamid im Säugetierorganismus erst in die wirksame Form umgewandelt werden. Diese Umwandlung ist offenbar mit einer oxydativen Spaltung des phosphorhaltigen Ringsystems im Cyclophosphamid verbunden. (BROCK und HOHORST, 1967). Diese Umwandlung erfolgt ganz bevorzugt in der Leber durch die in den Mikrosomen lokalisierten "Pharmakon-abbauenden Fermentsysteme". Diese "mixed function oxydases" sind in der Lage, eine große Zahl körperfremder Substanzen oxydativ zu verändern. Die aktivierte Form des Cyclophosphamids wird dann auf dem Blutwege gleichmäßig im Organismus verteilt und auch zu einem erheblichen Prozentsatz mit dem Urin ausgeschieden. Periphere Gewebe und besonders auch Tumoren sind offenbar nur in geringem Maße in der Lage, eine Aktivierung des Cyclophosphamids durchzuführen.

Über die eigentliche Wirkungsweise der alkylierenden Substanzen im Zellstoffwechsel proliferierender Gewebe ist bis heute - trotz intensiver Untersuchungen - nur recht wenig bekannt. Eine Alkylierung von DNA-Strukturen oder eine Beeinträchtigung von Mitose-Vorgängen in der G_2 -Phase werden diskutiert. Eine Hemmung der Zellvermehrung kann offenbar bereits nach Einwirkung von Dosen auftreten, die noch zu keiner Hemmung der DNA-Synthese-Vorgänge führen (LISS, 1968). Eine ausführliche Zusammenstellung der heutigen Vorstellungen über die Wirkungsweise alkylierender Substanzen wurde zum Beispiel von WHEELER (1967) gegeben. In unserer Arbeitsgruppe haben HELGE und ENGELS gefunden, daß mitochondriale DNA in einem

sehr viel höheren Ausmaß alkyliert wird als Zellkern-DNA. Die Bedeutung dieses Befundes ist zur Zeit noch unklar.

Cyclophosphamid (Endoxan) gehört zu den Substanzen, mit denen im Tierexperiment mit großer Sicherheit embryotoxische Wirkungen ausgelöst werden können. In solchen Versuchen werden Mißbildungen bereits dann beobachtet, wenn das Muttertier mit Dosen behandelt wird, die mindestens eine Zehnerpotenz unter der liegen, die für das erwachsene Tier letal sind. Embryonales Gewebe scheint also eine besonders hohe Empfindlichkeit gegen über diesem Cytostaticum zu besitzen.

2.3. Azathioprin

Azathioprin gehört zur Gruppe der Antimetaboliten, genauer gesagt, zu den Purin-Antagonisten. Das zunächst cytostatisch unwirksame Azathioprin wird in-vivo in das wirksame 6-Mercaptopurin umgewandelt. Hierfür werden enzymatische Reaktionen benutzt, die zur Umwandlung physiologischer Basen in die betreffenden Nucleoside angelegt sind. 6-Mercaptopurin beziehungsweise die daraus im Organismus entstandenen Nucleotide greifen in Synthese-Vorgänge von Nucleinsäure-Vorstufen ein. Hierdurch wird die "de-novo"-Synthese von Adenin- und Guanin-Nucleotiden blockiert.

Klinisch wird Azathioprin (Imuran) sehr häufig zur Immunsuppression benutzt. Verglichen mit anderen Cytostatica hat es offenbar nur wenige Nebenwirkungen. Embryotoxische Effekte sind von 6-Mercaptopurin vielfach beschrieben worden. Mit Azathioprin treten solche Effekte offenbar in weit geringerem Umfange auf.

2.4. Allgemeine Vorbemerkungen zum Problem der Medikamenten-

Kombination

Bei der Benutzung wirksamer Medikamenten-Kombinationen können sowohl synergistische als auch antagonistische Effekte auftreten:

a. Synergistische Effekte

1. Addition: Der Effekt entspricht bei einer solchen Wirkung etwa der Summe der prozentualen Wirkungen nach Anwendung der einzelnen Pharmaka. Dieser Effekt ist bei synergistischen Wirkungen der häufigste. Sehr viel seltener tritt auf eine
2. Potenzierung: Die Wirkung bei Applikation einer Kombination beträgt hier mehr als die Summe der Veränderungen, die bei Applikation der einzelnen Pharmaka zu erwarten wären. ("über-additiver Effekt"). Eine Potenzierung liegt immer dann vor, wenn die Wirkung eines Pharmakons durch Kombination mit einer unterschwelligen Dosis eines anderen verstärkt wird.

b. Antagonistischer Effekt

Die Wirkung der Einzelkomponenten kann bei einer Kombination auch abgeschwächt werden. ^{Die/}Ursache einer derartigen antagonistischen Wirkung kann sehr verschiedenartig sein und sowohl im Stoffwechsel des einen Pharmakons als auch in einer Konkurrenz am Rezeptor zu suchen sein.

3. Methodik und Versuchsdurchführung

Die in dieser Arbeit zusammengestellten Untersuchungen wurden an Ratten durchgeführt. Diese Versuchsspezies ist im Bezug auf embryotoxische Wirkungen gegenüber Cyclophosphamid recht

empfindlich, reagiert in der Organogenese-Phase aber nur wenig auf Azathioprin.

3.1. Haltung und Paarung der Versuchstiere

Für die Versuche wurden 84 schwangere Ratten der Stämme Wistar SW 64 und SW 69 verwendet. Etwa 750 Feten wurden ausgewertet. Als Futter erhielten die Tiere Altromin-R. Sie hatten dauernden Zugang zu Leitungswasser. Die Raumtemperatur betrug 25⁰, die Luftfeuchtigkeit 50 - 60 %. Der Cyclus von Ratten dauert 3 - 4 Tage. Normalerweise erfolgt die Ovulation kurz nach Mitternacht. Die hormonale Regulation wird ganz offenbar durch Licht gesteuert. Hieraus folgt, daß der Ovulationstermin durch Dauerbelichtung willkürlich verschoben oder sogar unterdrückt werden kann.

Unsere Versuchstiere wurden in einem veränderten Tag-Nach-Rhythmus gehalten, um den Zeitpunkt der Ovulation in die Arbeitszeit fallen zu lassen. Die Tiere hatten 16 Stunden Licht, und zwar von 12.00 Uhr mittags bis 4.00 Uhr morgens. Die Paarung erfolgte für zwei Stunden von 8.00 - 10.00 Uhr morgens. Dabei wurden drei Weibchen zu einem Männchen in einem Makrolon-Käfig zusammengesetzt. Durch dieses Verfahren läßt sich der Zeitpunkt der Konzeption relativ genau ermitteln. Die Kenntnis des exakten Alters der Embryonen ist notwendig, um die Pharmaka in einem definierten Stadium der Embryonal-Entwicklung zu applizieren.

Nach der Paarung wurden von den Tieren Vaginal-Abstriche angefertigt und mikroskopisch auf Spermien untersucht. Die Schwangerschaftsrate betrug bei diesem Verfahren etwa 80 %.

Als Tag 0 bezeichnen wir die 24-Stunden-Periode von 9.00 Uhr des Tages, an dem ein positiver Spermien-Nachweis gelang.

3.2. Behandlung der Versuchstiere mit Cyclophosphamid und Azathioprin

Eine zusammenfassende Darstellung der Versuchsserien ist aus der Tabelle 2 ersichtlich. Da während unserer Versuche beim Züchter ein Infekt auftrat, der bei den strengen Züchtungsbedingungen der SPF-Tiere zur Auflösung dieser Zucht zwang, mußten wir im Versuch von einem Wistar-Stamm auf einen anderen übergehen. In dieser Arbeit sind jedoch Kontrolltiere von beiden Wistar-Stämmen ausgewertet. Auf Unterschiede besonders in der Skelett-Entwicklung dieser beiden Stämme wird im Ver- suchsteil näher eingegangen.

3.2.o. Applikationszeit und Dosis der verabreichten

Cytostatica

Nach unseren heutigen Vorstellungen ist die Art eines embryo- toxischen Effektes abhängig von den Eigenheiten des Pharmakons und vor allem von dem Embryonal-Stadium, in dem das Pharmakon appliziert wird. Da der Zeitpunkt der Organ-Determination und der Organ-Differenzierung für die einzelnen Organe unter- schiedlich ist, treten bei Variationen des Applikationstermines auch verschiedenartige Formen der Mißbildungen auf.

Bei der Testung einer Arzneimittel-Kombination auf embryotoxi- sche Effekte kann man den Effekt entweder durch Einwirkung beider Pharmaka im gleichen Embryonal-Stadium testen, oder man kann einen Effekt nach sequentieller Gabe der beiden Phar- maka untersuchen. Wir haben uns entschlossen, in unseren Untersuchungen Azathioprin über einen Zeitpunkt von vier Tagen zu applizieren und Cyclophosphamid zusätzlich am zweiten dieser Tage zu applizieren.

Versuchsgruppen

Applizierte Cytostatica bzw. deren Kombinationen	Dosis	Tag der Applikation	Art der Applikation	Stamm	Benennung der Versuchsgruppen
Cyclophosphamid	4 mg/kg	12	intraperitoneal	Wistar SW 69	A 1
Cyclophosphamid	5 mg/kg	12	intraperitoneal	Wistar SW 64	A 2
Cyclophosphamid	6 mg/kg	12	intraperitoneal	Wistar SW 69	A 3
Azathioprin	5 mg/kg	11 - 14	oral	Wistar SW 69	B 1
Azathioprin	15 mg/kg	11 - 14	oral	Wistar SW 64	B 2
Azathioprin + Cyclophosphamid	5 mg/kg 4 mg/kg	11 - 14 12	oral intraperitoneal	Wistar SW 69	M 1
Azathioprin + Cyclophosphamid	15 mg/kg 6 mg/kg	11 - 14 12	oral intraperitoneal	Wistar SW 64	M 2
Cyclophosphamid	4 mg/kg	11	intraperitoneal	Wistar SW 64	O 1
Cyclophosphamid	6 mg/kg	11	intraperitoneal	Wistar SW 64	O 2
Azathioprin	5 mg/kg	10 - 13	oral	Wistar SW 64	P
Azathioprin + Cyclophosphamid	5 mg/kg 4 mg/kg	10 - 13 11	oral intraperitoneal	Wistar SW 64	Q
Kontrollgruppen	-	-	-	Wistar SW 64	K 1
	-	-	-	Wistar SW 69	K 2

Tabelle 2: Versuchsgruppen und Versuchsanordnung

3.2.1. Behandlung mit Cyclophosphamid

Als Cyclophosphamid wurde Endoxan der ASTA-Werke, Brackwede, verwendet. Die Substanz wurde den Muttertieren intraperitoneal appliziert. Die Muttertiere wogen ca. 200 g. Die Injektion erfolgte in der Zeit zwischen 8.00 und 10.00 Uhr morgens.

Die Behandlung mit Cyclophosphamid erfolgte am Tage 12 (in Dosen von 4, 5 und 6 mg/kg) sowie in einer weiteren Versuchsserie am Tage 11 der Schwangerschaft (4 und 6 mg/kg). Nach der Literatur und nach eigenen Vorversuchen liegen diese Dosen im Schwellenbereich beziehungsweise an der unteren Grenze der teratogenen Wirksamkeit.

3.2.2. Behandlung mit Azathioprin

Als Azathioprin verwendeten wir Imuran der Firma Wellcome Foundation, London. Nach einem Vorschlag der herstellenden Firma wurden 50 mg Azathioprin in 2 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung unter tropfenweiser Hinzugabe von 0,18 ml 1 n NaOH unter ständigem Rühren und leichtem Erwärmen gelöst. Die Lösung wurde dann auf 25 ml mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt und sofort für die Injektion verwendet. Die Versuchstiere erhielten die Substanz in der ersten Versuchsserie an den Tagen 11, 12, 13 und 14 oral (5 bzw. 15 mg/kg) und in einer weiteren Versuchsserie an den Tagen 10, 11, 12 und 13 (5 mg/kg).

Diese Dosen von Azathioprin liegen - ebenso wie die angewendeten Dosen von Cyclophosphamid - durchaus in dem Bereich, in dem die Verbindungen auch bei Menschen therapeutisch angewendet werden.

3.2.3. Behandlung mit Kombinationen von Cyclophosphamid ----- und Azathioprin -----

Drei Gruppen von Versuchstieren wurden mit Kombinationen der beiden Cytostatica behandelt. 5 bzw. 15 mg Azathioprin wurden in diesen Versuchsserien mit 4 bzw. 6 mg Cyclophosphamid kombiniert.

3.2.4. Behandlung der Kontrolltiere -----

Den Kontrolltieren wurden die Lösungsmittel der genannten Pharmaka ohne Wirkstoffe zum gleichen Zeitpunkt appliziert.

3.3. Methoden zur Auswertung der Versuchsergebnisse

3.3.1. Sectio der Muttertiere -----

Die Sectio fand am Tage 21 plus 0 statt. Unmittelbar nach Decapitierung und nachfolgender Sectio wurde die Zahl der lebenden Feten und die Zahl der Resorptionen festgestellt und das Gewicht der Embryonen ohne Eihäute und Placenten bis auf 10 mg genau bestimmt. An äußeren Auffälligkeiten fanden sich in allen Serien nur vereinzelt allgemeine Ödeme, Anasarka und Meningocelen.

3.3.2. Präparierung und Aufhellung der Embryonen -----

Nach dem Wiegen wurden die Embryonen 14 Tage lang in 10 %ige Formollösung gelegt. Darauf wurden Haut, Augen, subepitheliales Fettgewebe und die Eingeweide entfernt. Die so vorbe-

reiteten Embryonen wurden darauf eine Stunde mit Aqua dest. ausgewaschen. Danach wurden sie 12 Stunden in Aceton gelegt. Das Aceton wurde nach 30 Min. einmal gewechselt. Die eigentliche "Aufhellung" erfolgte in 10 %iger KOH-Lösung, in der 6 mg/1000 ml Alizarin gelöst waren nach der Methode von STAPLES und SCHNELL (1964). Diese Lösung wurde an den folgenden 6 - 8 Tagen häufig erneuert. Um das Skelett gut zu erhalten und es stärker anzufärben, erniedrigten wir in den letzten zwei Tagen die Konzentration der KOH-Lösung auf 1 % bei gleichbleibender Alizarin-Konzentration. Nach erfolgter Aufhellung und Färbung wurden die Embryonen eine halbe Stunde in Aqua dest. ausgewaschen.

Die so aufbereiteten Embryonen wurden zwölf Stunden in ein Gemisch aus Benzylalkohol, Äthanol und Glycerin im Verhältnis 1:2:2 gelegt und dann in Glycerin konserviert. Die Auswertung der Skelett-Abnormitäten erfolgte in Anlehnung an die Methode von LORKE (1965).

4. Ergebnisse und Diskussion

=====

Als "embryotoxische" Effekte wurden in dieser Arbeit ausgewertet:

1. Embryo-Mortalität (Zahl der Resorptionen)
2. Retardierungen (Gewicht der Feten am Tag21) und
3. Veränderungen in der Entwicklung und der Verknöcherung des Skelettsystems.

Leider mußten für die vorgesehenen Experimente aus versuchstechnischen Gründen zwei verschiedene Stämme, der Stamm Wistar SW 64 und der Stamm Wistar SW 69, benutzt werden. Dadurch sind nicht alle Dosis-Wirkungsbeziehungen und alle Kombinationen untereinander vergleichbar. Dies betrifft weniger die Embryo-Mortalität und die Gewichtsentwicklung als besonders die Entwicklung des Skelettsystems. Hier zeigen die - an sich sehr ähnlichen Rattenstämme - bereits deutliche Unterschiede in den Kontrollgruppen. Auch diese Ergebnisse bestätigen die Problematik des Begriffes "Wistar-Stamm".

4.1. Embryo-Mortalität

Die Zahl der beurteilten Keimanlagen und der Prozentsatz der Resorptionen ist in den Tabellen 3 und 4 zusammengestellt. Beide Stämme von Wistar-Ratten zeigten eine mittlere Zahl von Keimanlagen pro Muttertier von 8 - 9.

Die spontane Resorptionsrate der beiden benutzten Stämme ist recht gering. In unseren Versuchsserien konnten bei den Kontrolltieren keine Resorptionen gefunden werden. Aus größeren

Versuchs- gruppe	Dosis	Schwangere Tiere	Keiman- lagen	Keimanlagen /Muttertier	Resorptionen
A 1	4 mg/kg Cyclophos- phamid	5	48	9,6	1 ± 2 %
A 2	5 mg/kg Cyclophos- phamid	6	56	9,3	2 ± 4 %
A 3	6 mg/kg Cyclophos- phamid	9	77	8,6	3 ± 4 %
B 1	5 mg/kg Azathioprin	4	38	9,5	0
B 1	15 mg/kg Azathioprin	4	37	9,3	0
M 1	5 mg/kg Azathioprin + 4 mg/kg Cyclophos- phamid	5	43	8,6	0
M 2	15 mg/kg Azathioprin + 6 mg/kg Cyclophos- phamid	5	42	8,4	0
K 1	---	10	97	9,7	0
K 2	---	12	110	9,2	0
K 1 + K 2	---	22	207	9,4	0

Tabelle 3: Anzahl der Keimanlagen und Resorptionen in den Versuchs-
gruppen A, B und M.

Endoxan-Gabe: am Tag 12

Azathioprin-Gabe: an den Tagen 11, 12, 13, 14.

Versuchs- gruppe	Pharmakon	Dosis	Tag der Applikation	Schwangere Tiere	Keimanlagen /Muttertier	Resorptionen
O 1	Cyclophosphamid	4 mg/kg	11	6	52	8,7
O 2	Cyclophosphamid	6 mg/kg	11	6	49	8,2
P	Azathioprin	5 mg/kg	10-13	6	44	8,8
Q	Azathioprin	5 mg/kg	10-13	6	52	8,7
	+ Cyclophosphamid	4 mg/kg	11			7 ± 13 %
K 1	---	---	---	10	97	9,7
						0

Tabelle 4: Anzahl der Keimanlagen und Resorptionen in den Versuchsgruppen O, P und Q.

Endoxan-Gabe: am Tag 11

Azathioprin-Gabe: an den Tagen 10, 11, 12, 13.

Versuchsreihen, die in unserem Institut durchgeführt wurden, wissen wir, daß die spontane Resorptionsrate etwa bei 3 % liegt.

In den Versuchsgruppen A 2 und A 3 - d.h. nach Behandlung mit 5 oder 6 mg/kg Cyclophosphamid am Tag 12 der Schwangerschaft - scheint die Resorptionsrate etwas erhöht zu sein. Bei der geringen Zahl der ausgewerteten Foeten ist dieser Effekt jedoch statistisch nicht signifikant.

Eine eindeutige Erhöhung der Embryo-Mortalität ergibt sich jedoch nach Applikation von 6 mg/kg Cyclophosphamid am Tag 11 der Schwangerschaft (Gruppe O 2). 4 mg/kg Cyclophosphamid rufen jedoch in unseren Experimenten auch am Tage 11 der Schwangerschaft keine verstärkte Embryo-Mortalität hervor. Das Ergebnis bestätigt die steile Dosis-Wirkungsbeziehung, die von einer größeren Zahl embryotoxischer Substanzen her bekannt ist.

Azathioprin hat in unseren Versuchen bei einer Dosierung zwischen 5 und 15 mg/kg über vier Tage der Schwangerschaft gegebenen keinen embryoletalen Effekt.

Besonders interessant erscheinen die Resultate der Kombinationsversuche. In den Versuchsserien M1 und M2 wurden keine Resorptionen gefunden. Eine starke Zunahme des embryoletalen Effektes in der Kombination ist daher sicher nicht vorhanden. Allerdings ergeben die Ergebnisse der Versuchsserie Q ein anderes Bild. Während Cyclophosphamid allein (4 mg/kg) und Azathioprin allein (5 mg/kg) zu keiner erkennbaren Embryo-Mortalität führen, treten in der Kombinationsgruppe 13 % Resorptionen auf. Dieser Effekt ist sicherlich statistisch signifikant.

Bei einer Gabe von Cyclophosphamid am Tage 11 der Schwangerschaft kann daher nach unseren Versuchen ein potenzierender Effekt mit einer unterschwelligen Dosis Azathioprin im Bezug auf die Embryo-

Agents	Dose mg/kg	Tag	% Dead or Resorbed	% Survivors Malformed	Autur Jahr
6 Mercaptopurin	10	9	55,1 %	4,5 %	Wilson 1964
6 Mercaptopurin	5	9	14,7 %	2,3 %	
Azathioprin	2,5	6 - 12	20 %		TUCHMANN - DUPLESSIS 1969
Azathioprin	10	6 - 8	100 %		
6 Mercaptopurin	0,5	6 - 12	20 %	14 %	
6 Mercaptopurin	0,75	6 - 12	80 %	12 %	
Azathioprin	2,5	3 - 12	40 %		TUCHMANN - DUPLESSIS et MERCIER - PAROT 1966
Azathioprin	2,5	6 - 12	20 %		
Azathioprin	2,5	8 - 10			
Azathioprin	5	6 - 8	30 %		
Azathioprin	5	6 - 9	30 %		
Azathioprin	10	6 - 8	100 %		
Azathioprin	10	6 - 9	80 %		
Azathioprin	10	8 - 10	100 %		
6 Mercaptopurin	0,5	7 - 9		14 %	TUCHMANN - DUPLESSIS 1969
6 Mercaptopurin	0,75	7 - 9		12 %	
6 Mercaptopurin	50	12		5,5 %	
6 Mercaptopurin	50	13		46,7 %	
Azathioprin	2,5	6 - 12			
Azathioprin	5	6 - 9			
Azathioprin	60	12			
Azathioprin	80	12			

Tab. 5 Zusammenstellung von Versuchsansätzen mit
6 Mercaptopurin und Azathioprin aus der Literatur

Agents	Dose (mg/kg)	No. of Implants	% Dead or Resorbed	% Survivors Malformed
Cyclophosphamid	10	166	55,4	25,7
Cyclophosphamid	5	208	10,1	4,8
Cyclophosphamid	2,5	138	5,1	0,8

Tabelle 6: Aus WILSON, J., J. Pharm. exp. Ther. 144,
434 (1964)

Mortalität nicht ausgeschlossen werden.

Untersuchungen über die embryoletale Wirkung von Cyclophosphamid liegen bereits in der Literatur vor (WILSON 1964 - CHAUBE and MURPHY 1967 - VON KREYBIG 1968). WILSON (1964) konnte nach Applikation von Cyclophosphamid am Tag 9 der Gestation bei Dosierungen zwischen 5 und 10 mg/kg eine erhebliche Erhöhung der Embryo-Mortalität feststellen (siehe Tabelle 6). Diesen Befund konnte von KREYBIG bestätigen. Auch er fand die stärkste embryoletale Wirkung von Cyclophosphamid an den Tagen 9 und 10 der Gestation (unsere Nomenclatur !). Sowohl vor als auch nach dieser Periode gibt von KREYBIG eine sehr viel höhere Dosis als 10 mg /kg für eine embryoletale Wirkung an. Demgegenüber ist in unseren Versuchen auch noch am Tage 11 der Gestation mit der niedrigen Dosis von 6 mg/kg ein deutlicher embryoletaler Effekt zu erzielen. Die Angaben in der von KREYBIG-schen Arbeit (1967) stimmen allerdings auch in anderer Hinsicht nicht mit den bei unseren Rattenstämmen ermittelten Daten überein. So gibt von KREYBIG die Nidation am Ende des Tages 5 an, während bei Versuchen in unserem Institut und auch sonst in der Literatur allgemein Übereinstimmung besteht, daß die Blastozyste bei der Ratte in der zweiten Hälfte des Tages 4 implantiert. Auch die in dieser Arbeit niedergelegte Angabe, daß der Nabelanschluß zwischen Tag 10 und 11 erfolgt, stimmt mit Versuchen aus unserem Institut nicht überein. Nach eigenen Untersuchungen erfolgt der Beginn der Placentar-Funktion am Tage 12 der Schwangerschaft.

Allgemein besteht jedoch in der Literatur Übereinstimmung darüber, daß am Tage 11 der Schwangerschaft bei der Ratte die frühe Phase der Organogenese abgeschlossen ist.

Angaben über die embryotoxischen Effekte von Azathioprin aus der Literatur sind in der Tabelle 5 zusammengestellt. Wie oben beschrieben, wird Azathioprin im Organismus in 6-Mercaptopurin umgewandelt. Unter einem gewissen Vorbehalt kann man

daher die Wirkungen von Azathioprin (Imuran) und 6-Mercaptopurin vergleichen. Es soll allerdings ausdrücklich betont werden, daß TUCHMANN-DUPLESSIS erhebliche Speziesunterschiede bei der Wirkung dieser beiden Substanzen aufgezeigt hat.

In den von uns durchgeführten Untersuchungen und in der von uns benutzten Phase der Embryonalentwicklung ist der embryonale letale Effekt - selbst nach Dosen von 15 mg/kg - offenbar sehr viel geringer als in der Literatur bei einer Gabe in früheren Phasen der Entwicklung beschrieben.

4.2. Durchschnittsgewicht der Feten

Die Durchschnittsgewichte der Rattenfeten am Tage der Sectio sind den Tabellen 7 und 8 zu entnehmen. Auffallend ist das relativ homogene Gewicht der Kontrollgruppen. Wir haben daher die Kontrollgruppen K 1 und K 2 noch zusammen ausgewertet und die Gesamt-Kontrollen mit den experimentellen Daten verglichen.

Nach Gabe von Cyclophosphamid läßt sich eine signifikante Retardierung - verglichen mit den Kontrollen - in den Versuchsgruppen A 1, A3 und O 1, O2 nachweisen. Obgleich die Unterschiede in den Gewichten verglichen mit den Kontrollen relativ gering sind (meist weniger als 10 %) wird der Unterschied bei der relativ großen Zahl der Foeten statistisch signifikant. Eine Gewichtsverminderung stellt häufig das empfindlichste Kriterium beim Nachweis einer embryotoxischen Wirkung dar.

Auch nach Gabe von Azathioprin läßt sich eine deutliche Gewichtsverminderung in den Gruppen B 1 und B 2 nachweisen. Allerdings ist in der Versuchsgruppe P kein signifikanter Unterschied gegenüber den Kontrollen vorhanden.

Versuchs- gruppe	Feuchtgewichte (M±SD)	t	P	Signifikante Veränderung
A 1	2,75 ± 0,35	3,3	0,001	+++
A 2	2,88 ± 0,30	1,2	0,3	Ø
A 3	2,62 ± 0,30	7,4	0,001	+++
B 1	2,74 ± 0,38	3,0	0,001	+++
B 2	2,66 ± 0,43	3,7	0,001	+++
M 1	2,65 ± 0,20	7,4	0,001	+++
M 2	2,42 ± 0,40	7,9	0,001	+++
K 1	2,93 ± 0,25	0,3	0,8	Ø
K 2	2,94 ± 0,41	0,3	0,8	Ø
K 1 + K 2	2,94 ± 0,34	+	-	

Tabelle 7: Durchschnittsgewichte der Feten bei der Sectio am Tag 21 der Schwangerschaft

Endoxan-Gabe: am Tag 12

Azathioprin-Gabe: an den Tagen 11, 12, 13, 14.

Versuchs- gruppe	Feuchtgewichte ($\bar{M} \pm SD$)	t	p	Signifikante Veränderung
O 1	2,71 $\pm$ 0,23	5,9	0,001	+++
O 2	2,63 $\pm$ 0,26	6,6	0,001	+++
P	2,84 $\pm$ 0,31	1,8	0,05	Ø
Q	2,72 $\pm$ 0,27	4,8	0,001	+++
K 1	2,93 $\pm$ 0,25	+	-	Ø

Tabelle 8: Durchschnittsgewichte der Feten bei der Sectio am Tag 21 der Schwangerschaft.

Endoxan-Gabe: am Tag 11

Azathioprin-Gabe: an den Tagen 10, 11, 12, 13.

Eine erhebliche Zunahme der Retardierung ergibt sich bei den Kombinationen nicht. Die vorliegenden Daten ergeben jedenfalls keinen Anhalt dafür, daß das Wachstum der Embryonen durch die Kombination erheblich stärker beeinflußt wird als durch die Einzelkomponenten.

Es soll allerdings noch erwähnt werden, daß embryonales Gewebe über die ausgeprägte Fähigkeit verfügt, aufgetretene Schäden auszugleichen. Es wäre daher denkbar, daß ein Retardierungseffekt kurze Zeit nach Gabe der Pharmaka ausgeprägter war und im Laufe der weiteren Entwicklung partiell ausgeglichen wurde. Diese Frage kann nur durch weitere Versuche beantwortet werden, in denen das Gewicht der Foeten beispielsweise am Tag 12 der Gestation untersucht wird.

4.3. Untersuchungen der Skelettentwicklung und -verknöcherung

Embryonale Effekte und Retardierungen müssen klar von Mißbildungen unterschieden werden. Der Begriff der Mißbildung ist allerdings schwer zu definieren. Beim heutigen Sprachgebrauch werden unter Mißbildungen vorwiegend makroskopisch sichtbare Abnormalitäten verstanden. Diese Betrachtungsweise ist sicherlich einseitig, da auch im lichtmikroskopischen Bereich zweifellos "Mißbildungen" vorhanden sein können. Die Unsicherheit wird noch größer, wenn auch Abnormalitäten im Bereich der Mikromorphologie (Elektronenmikroskopie) oder im Bereich der molekularen Biologie beurteilt werden sollen. Angeborene Stoffwechselanomalien können jedoch zweifellos ebenfalls der Ausdruck einer "Mißbildung" sein.

Bei der Auswertung von Mißbildungen im Tierexperiment ist es schwierig - selbst bei ausschließlich makroskopischer Betrachtungsweise - Mißbildungen der inneren Organe und beispielsweise des Skelettsystems gleichzeitig zu beurteilen. Meist wird daher so vorgegangen, daß ein Teil der durch Sectio ge-

wonnenen Feten zur Beurteilung von Mißbildungen an den inneren Organen verwandt wird, während ein weiterer Teil nach "Aufhellung" auf Mißbildungen im Bereich des Skelettsystems untersucht wird.

Wir haben uns im Rahmen dieser Arbeit auf die Beurteilung von Mißbildungen des Skelettsystems beschränkt. Dies scheint einmal bei Verwendung von Cyclophosphamid zulässig, da viele Abnormitäten der Skelettentwicklung auftreten und da zum anderen bei der Beurteilung von Kombinationswirkungen nur einzelne Mißbildungstypen in den verschiedenen Versuchsgruppen verglichen werden können.

Die Beurteilung des Skelettsystems erfolgte mit Hilfe einer Stereolupe. Um die morphologischen Beobachtungen an den Rattenembryonen übersichtlich darstellen zu können, haben wir die Ergebnisse quantitativ ausgewertet. Die Prozentzahlen geben die Feten mit der betreffenden Anomalie wieder. Die Häufigkeit der Anomalien pro Embryo wurde nicht ausgewertet. Die Kriterien für die Einordnung der morphologischen Auffälligkeiten haben wir folgendermaßen definiert.:

- a. Veränderungen am Sternum heißt in dieser Arbeit, daß mindestens ein Sternumkern fehlt.
- b. Beim Hyoid wurde nur vollständiges Fehlen der Verknöcherung registriert.
- c. Bei den Vertebrae konnten wir nur Veränderungen am Corpus feststellen. Diese Veränderungen wurden in hantelförmige Verkleinerungen und sagittale Veränderungen (Spaltung) aufgeteilt. Embryonen wurden als auffällig dokumentiert, wenn sie Veränderungen an mindestens einem Wirbelkörper aufzuweisen hatten.
- d. Eine Veränderung an der 13. Rippe bedeutet die minde-

stens einseitige Verkürzung dieser Rippe auf etwa die Hälfte der normalen Länge.

- e. Die 14. Rippe wurde als auffällig dokumentiert, wenn mindestens einseitig ein Rudiment vorhanden war.
- f. Eine Veränderung an den vorderen Extremitäten lag vor, wenn weniger als 3 Metacarpi an mindestens eine Extremität vorhanden waren.
- g. Am Os parietale wurde eine Veränderung registriert, wenn mangelnde und/oder abweichende Ossifikation vorhanden war. Wir untergliederten die Auffälligkeiten am Parietalknochen in rechtsseitige oder beidseitige Veränderungen.
- h. Veränderungen am Os interparietale registrierten wir, wenn die Ossifikation nur gering oder gar nicht vorhanden war.
- i. Veränderungen am Os supraoccipitale registrierten wir, wenn die Ossifikation nur gering oder gar nicht vorhanden war.

Die morphologischen Auffälligkeiten bei der Inspektion der Rattenembryonen nach deren Skelettaufhellung sind in den Tabellen 9 und 10 zusammengestellt. Aussagen lassen sich jedoch nur mit Einschränkungen machen, da die Kontrollgruppen selbst schon bisweilen eine recht hohe Veränderungsrate aufweisen.

Auffällig sind bereits Unterschiede in der normalen Entwicklung der beiden Stämme Wistar SW 64 und Wistar SW 69. Dies ist bei der Anlage der Sternum-Kerne besonders ausgeprägt. So fehlen beim Stamm Wistar SW 64 lediglich bei 17 % der Feten Sternum-Kerne. Bei Stamm Wistar SW 69 sind es jedoch 51 %. Es ergibt sich hier wie bei einige anderen Veränderun-

Veränderungen	Prozent der Veränderungen pro Versuchsserie									
	SW 64					SW 69				
	A 2	B 2	(A3+B2) M 2	K 1	A 1	A 3	B 1	(A1+B1) M 1	K 2	
Sternum-Kerne	15	19	57	17	72	92	66	88	51	
Fehlendes Hyoid	9	3		9	17	7	16	12	14	
vertebrae hantelförmig	22	19	31	7	2	15		2	1	
vertebrae gespalten	7	11	15	2		5		5	1	
14. Costae				7	2	7	16		16	
Vordere Extremitäten		3		2				2	5	
Os nur rechts				2	2			5	1	
parietale gesamt	2	51	21	12	2	10	8	14	17	
Os interparietale		49	31	2	2	16	3	19		
Os supraoccipitale		3	10	2	4	31	11	19	15	

Tabelle 9: Darstellung der morphologischen Veränderungen bei Gabe von Endoxan am Tag 12.

Endoxan: A 1 (4 mg/kg), A 2 (5 mg/kg), A 3 (6 mg/kg)

Azathioprin: B 1 (5 mg/kg), B 2 (15 mg/kg)

M = Kombination

Die der Kombination M 2 entsprechende Gruppe mit 6 mg/kg konnte mit dem Stamm SW 64 nicht mehr angesetzt werden.



= Verringerte Wirkung gegenüber Kontrollen oder Antagonismus in der Kombination



= Deutliche Verstärkung gegenüber Kontrollen oder Synergismus in der Kombination



= weniger als Addition
I = etwa additiver Effekt

Versuchs- gruppe	Applizierte Cytostatica	Dosis der Pharmaka	Tag der Applikation	Veränderungen an den Costae 13.	V E R T E B R A E		
					hantelförmig	gespalten	zusammengewachsen
O	Cyclophosphamid	4 mg/kg	11		56 %	32 %	
P	Cyclophosphamid	6 mg/kg	11	50 %	75 %	80 %	25 %
Q	Azathioprin	5 mg/kg	10 - 13	25 %	50 %		
R	Azathioprin	5 mg/kg	10 - 13				
	+ Cyclophosphamid	4 mg/kg	11	6,7 %	62,3 %	33,3 %	
K 1					7,2 %	7,2 %	1,5 %

Tabelle 10: Morphologische Veränderungen bei Applikation von Cyclophosphamid am Tag 11.
Wistar SW 64

gen die Frage, ob diese Kerne bei den beiden verschiedenen Stämmen zu einem verschiedenen Zeitpunkt angelegt werden. Das Fehlen der betreffenden Kerne oder der betreffenden Verknöcherungszonen würde dann eher eine Retardierung als eine "Mißbildung" aufzeigen. Gerade bei der Anlage von Sternum-Kernen sind - wie auch eine Durchsicht der Literatur zeigt (FRITZ and HESS 1970) - erhebliche Variationen vorhanden.

Der Anstieg dieser Veränderungen an den Sternum-Kernen bei dem Stamm SW 69 unter der Wirkung von Cyclophosphamid könnte ebenfalls darauf hindeuten, daß durch Cyclophosphamid eine weitere Verzögerung der Anlage dieser Kerne hervorgerufen wird. Auch dies wäre dann ein Zeichen einer Retardierung. Bei dem Stamm SW 64 tritt eine solche Wirkung in sehr viel geringerem Maße auf.

Ähnliche, stammesspezifische Unterschiede treten auch bei der fehlenden Verknöcherung des Hyoids auf. Allerdings ist der Unterschied zwischen den beiden Stämmen relativ gering.

Bei der Untersuchung der Foeten auf Mißbildungen waren die Auffälligkeiten an den Vertebrae am eindrucksvollsten. Die hier aufgeführten hantelförmigen Veränderungen oder die gespaltenen Wirbel können sicher als echte Mißbildungen aufgefaßt werden und stellen keine Zeichen einer Retardierung dar.

Auch das Auftreten hantelförmiger Wirbelkörper trat spontan bei beiden Rattenstämmen auf, allerdings in unterschiedlichem Maße. In diesem Falle war der Stamm SW 64 häufiger befallen (7 %) als der Stamm SW 69 (1 %).

Sowohl durch Cyclophosphamid als auch durch Azathioprin wird die Häufigkeit dieser Mißbildung eindeutig erhöht.

Weniger aussagekräftig sind die Veränderungen an den Rippen. Auch hier ergaben sich bei den Kontrollen gewisse Stammesunter-

schiede. Eine Auswertung der Versuchsgruppen war jedoch unergiebig.

Gleiches gilt auch für die Auswertung von Anomalitäten an den vorderen Extremitäten.

Für unsere Fragestellung interessant war hingegen wieder die Wirkung auf die Entwicklung der Schädelknochen. Auch in diesem Falle ist allerdings schwer zu entscheiden, ob es sich um die Folge einer Retardierung oder um eine echte "Mißbildung" handelt. Besonders am Os supraoccipitale waren die Unterschiede auch in den Kontrollgruppen erheblich. Veränderungen traten beim Stamm SW 64 in 2 %, bei dem Stamm SW 69 hingegen bei 15 % der Feten auf.

An den Schädelknochen konnten mit beiden Cytostatica deutliche Veränderungen hervorgerufen werden. Die genaue Aufschlüsselung geht aus den Daten der Tabelle 9 hervor.

4.4. Analyse der Wirkungen einer Kombination von Endoxan und Imuran

Besonders interessierten uns natürlich die Veränderungen, die bei den Tiergruppen auftraten, die mit einer Kombination von Endoxan und Imuran behandelt wurden, verglichen mit Versuchsserien, in denen beide Cytostatica allein appliziert wurden.

Auf eine gewisse "Potenzierung" der Embryo-Mortalität bei der Kombination in einem bestimmten Stadium der Embryonalentwicklung wurde bereits im Abschnitt 4.1. hingewiesen:

Es wurde bereits ebenfalls ausgeführt, daß im Bezug auf die Retardierungen kein Anhalt für einen synergistischen Effekt erhalten werden konnte.

Die Auswertung der Skelettveränderungen war für die Beantwortung der gestellten Frage besonders aufschlußreich.

Als auffälligstes Resultat dieser Arbeit kann gewertet werden, daß ein "Synergismus" nur in Ausnahmefällen registriert werden konnte.

So war bei der Beurteilung des Os interparietale der Prozentsatz der Abnormitäten in der Kombination (Endoxan 4 mg/kg - Azathioprin 5 mg/kg) mit 19 % deutlich höher, als einer Addition entsprechen würde (4 mg/kg Endoxan = 2 % und 5 mg/kg Azathioprin = 3 %).

Eine nahezu additive Wirkung bei der Kombination der beiden Cytostatica kann in der einen Versuchsserie (SW 69) auch bei Veränderungen des Os supraoccipitale registriert werden. Auch hier wurden bei der Kombination (4 mg/kg Endoxan und 5 mg/kg Azathioprin) 19 % Abnormitäten beobachtet. Die Häufigkeit der Veränderungen bei Gabe der beiden Komponenten allein betrug 4 % (4 mg/kg Endoxan) beziehungsweise 11 % (5 mg/kg Azathioprin).

Diesen beiden Beispielen, in denen die Kombination der beiden Cytostatica Cyclophosphamid und Azathioprin zu einer Addition der Wirkungen auf die Skelettverknöcherungen führt, oder eventuell sogar zu einer gewissen Potenzierung, steht die Mehrzahl der in dieser Arbeit erhobenen Befunde gegenüber, die ganz eindeutig einen Antagonismus dieser beiden Cytostatica zeigen in Bezug auf die ausgelösten Abnormitäten im Skelettsystem. Es ist allerdings bemerkenswert, daß diese antagonistischen Effekte ganz überwiegend bei dem Stamm SW 64 beobachtet wurden.

Als echte "Mißbildungen" können sicher die Veränderungen an den Wirbelkörpern (hantelförmig beziehungsweise gespalten) gewertet werden. Bei allen Versuchsserien, für die in die-

ser Arbeit eine genügende Anzahl von Befunden vorliegen, ergibt sich an diesem Testsystem ein eindeutig antagonistischer Effekt:

5 % gespaltenen Wirbelkörpern (Serie M 2 in der Kombination) stehen 11 % derartiger Veränderungen bei Gabe von 15 mg/kg Azathioprin allein gegenüber. Auch in der Versuchsserie, in der Cyclophosphamid am Tage 11 appliziert wurde, scheint ein ähnlicher Effekt vorzuliegen. Allerdings fehlt hier der entsprechende Wert für Azathioprin allein (Versuchsgruppen O 1 und Q).

Auch bei den hantelförmigen Veränderungen der Vertebrae kann ein antagonistischer Effekt nachgewiesen werden. So sind in der Kombination (M 2) 31 % derartiger Veränderungen beobachtet worden, während mit Azathioprin allein (15 mg/kg) nur 19 % auftraten. x)

Sehr ähnlich liegen die Verhältnisse auch bei einer Kombination der hohen Azathioprin-Dosis (15 mg/kg) mit Cyclophosphamid, wenn Veränderungen am Os parietale und am Os interparietale ausgewertet werden. Die Kombination der beiden Cytostatica hat am Os parietale in 21 % zu Veränderungen geführt, während Azathioprin in der entsprechenden Dosis allein in 51 % der Fälle zu entsprechenden Abnormitäten Anlaß gab. Ähnlich liegen die Verhältnisse beim Os interparietale. Hier stehen 31 % der Abnormitäten in der Kombination (M 2) 49 % der entsprechenden Veränderung bei Azathioprin allein gegenüber.

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit zusammengestellten Versuche zeigen also eindeutig, daß in der Mehrzahl der Fälle und besonders bei den Untersuchungsergebnissen, die als echte "Mißbildungen" gewertet werden können, eine Kombination der beiden Cytostatica Cyclophosphamid und Azathioprin nicht zu einer wesentlichen Verstärkung der embryotoxischen und teratogenen Wirkung dieser Substanzen führen muß. Ein antagoni-

x) Statistisch (Tab. 11) ist der Effekt jedoch nicht eindeutig zu sichern.

Beobachtete Veränderungen		% Veränderungen	Zahl der Tiere in den Einzel-Gruppen		Zahl der Tiere in der Kombination		χ^2	Signifikant
			verändert	unverändert	verändert	unverändert		
Hantelförmige Vertebrae	Endoxan	> 22	12	42	13	29	> 0,4	<u>nicht</u>
	Imuran	19	7	30				
	erwartete Σ	> 41	≈ 15	22				
Gespaltene Vertebrae	Endoxan	> 7	4	50	2	40	> 2,6	nicht eindeutig
	Imuran	11	4	33				
	erwartete Σ	> 18	≈ 7	30				
Os Parietale rechts + links	Endoxan	> 2	1	53	9	33	> 7,7	ja
	Imuran	51	19	18				
	erwartete Σ	> 53	20	17				
Os Interparietale	Endoxan	2	1	45	8	35	2,1	<u>nicht</u>
	Imuran	3	1	37				
	erwartete Σ	5	2	35				

Tabelle 11: Signifikanzberechnungen einiger Skelettveränderungen nach dem χ^2 -Test

In den Serien, bei denen die entsprechenden Dosierungen der Einzel-Anwendung fehlten, wurde die entsprechend niedrigere Dosierung eingesetzt. Erwartete Σ = Addition der prozentualen Effekte, berechnet auf die kleinste Tierzahl der Einzelgruppen.

stischer Effekt wird besonders bei der Kombination höherer Dosen dieser Substanzen auffällig.

Es erhebt sich die Frage, wie derartige antagonistische Effekte zustande kommen können. Es wäre einmal denkbar, daß durch einen retardierenden Effekt durch das eine Pharmakon die gegenüber dem zweiten Pharmakon empfindliche Phase verschoben wird. Auf diese Weise könnte die Wirkung des zweiten Pharmakons in eine veränderte Phase der Embryonalentwicklung fallen und damit einen geringeren Effekt auslösen. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit könnte darin bestehen, daß die beiden Cytostatica gegenseitig die Metabolisierung im Organismus beeinträchtigen. Beide Pharmaka - sowohl Cyclophosphamid als auch Azathioprin - werden im Organismus umgewandelt, Cyclophosphamid in der Leber durch Oxydation und Überführung in die "aktive Form" und Azathioprin durch oxydative Degradation, überwiegend durch das Ferment Xanthin-Oxydase.

Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, den Mechanismus der antagonistischen Wirkung aufzuklären. Unsere Versuche haben jedoch ergeben, daß bei einer Kombination embryotoxisch wirksamer Substanzen durchaus nicht in jedem Fall damit gerechnet werden muß, daß sich die Wirkungen verstärken.

Es soll zum Schluß noch betont werden, daß sich die hier diskutierten Ergebnisse zunächst nur auf eine Tierart beziehen und auf einen bestimmten Applikationsmodus. Es erscheint uns gerechtfertigt, die Kombinationswirkung Cyclophosphamid-Azathioprin in weiteren Untersuchungen noch ausführlicher zu analysieren.

5. Zusammenfassung

=====

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die embryotoxische und teratogene Wirkung einer Kombination von Cyclophosphamid und Azathioprin bei Ratten zu untersuchen.

Als Versuchstiere wurden Ratten der Stämme Wistar SW 64 und Wistar SW 69 benutzt.

a. Am Tag 12 beziehungsweise 11 der Schwangerschaft wurde den Muttertieren 4, 5 bzw. 6 mg/kg Cyclophosphamid appliziert. Am Tage 11 - 14 bzw. 10 - 13 wurden den Muttertieren 5 bzw. 15 mg/kg Azathioprin verabreicht. In drei weiteren Versuchsserien wurden Azathioprin und Cyclophosphamid an den beschriebenen Tagen kombiniert verabreicht. Am Tag 21 der Gestation wurden die Feten durch Sectio gewonnen. Die Feten wurden makroskopisch beurteilt und gewogen. Außerdem wurde die Skelettentwicklung nach "Aufhellung" und Anfärben des Skeletts durch Alizerin beurteilt.

b. Eine geringgradige Erhöhung der Resorptionsraten (auf 3,6 - 4,2 %) wurde in den Versuchsgruppen der mit Cyclophosphamid am Tag 12 behandelten Tiere gefunden. Jedoch erfolgte bei Gabe von 6 mg/kg Cyclophosphamid am Tag 11 eine Resorptionsrate von 18,4 %.

c. Das Durchschnittsgewicht der Versuchstiere war bei neun von elf Versuchsgruppen signifikant geringer als bei Kontrolltieren.

d. Bezüglich der morphologischen Auffälligkeiten wurden fehlende Sternumkerne, fehlendes Hyoid, hantelförmige oder gespaltene Vertebrae, rudimentäre 13. oder 14. Costae, weniger als drei Metacarpalae der vorderen Extremitäten und Veränderungen der Verknöcherung des Os parietale, interparietale und supraoccipitale gefunden.

e. Bemerkenswert war der relativ große Unterschied zwischen den beiden Kontrollserien (SW 64 und SW 69) bei bestimmten morphologischen Auffälligkeiten wie zum Beispiel bei Sternukernen, dem Fehlen des Hyoids, bei hantelförmig geformten Vertebrae sowie bei Veränderungen am Os supraparietale. Diese Veränderungen werden durch den cytostatischen Effekt von Cyclophosphamid und Azathioprin eindeutig verstärkt.

f. Weiter kann bestätigt werden - wie aus der Literatur hinreichend bekannt - daß die zeitliche Verschiebung der Applikation von Cytostatica sowohl Zahl als auch Art der Schädigungen beeinflussen. Während 4 mg/kg Endoxan am Tag 12 der Schwangerschaft keine signifikante Veränderung hervorrufen, sind einige der getesteten Parameter nach 5 mg/kg - und ausgeprägter nach 6 mg/kg - deutlich verändert. 5 mg/kg Azathioprin zeigen keinen nachweisbaren Effekt auf die Skelettentwicklung. Aber höhere Dosen (15 mg/kg), appliziert am 11. - 14. Tage, erhöhen deutlich die Auffälligkeitsrate (51,3 % bzw. 48,7 %) am Os parietale und Os interparietale.

g. Der Effekt einer Kombination von Cyclophosphamid und Azathioprin auf die Skelettentwicklung ist komplex. Eine "Potenzierung" kann höchstens bei Veränderungen am Os interparietale (SW 69) bei kleinen Dosen der Cytostatica abgelesen werden. Dem gegenüber kann an den Wirbelkörpern, am Os parietale und bei höherer Dosierung auch am Os interparietale (SW 64) eine eindeutige antagonistische Wirkung der beiden Cytostatica beobachtet werden. Auch bei der Applikation der Cytostatica zu einem etwa früheren Zeitpunkt kann kein Anhalt für einen additiven oder gar potenzierenden Effekt erhalten werden.

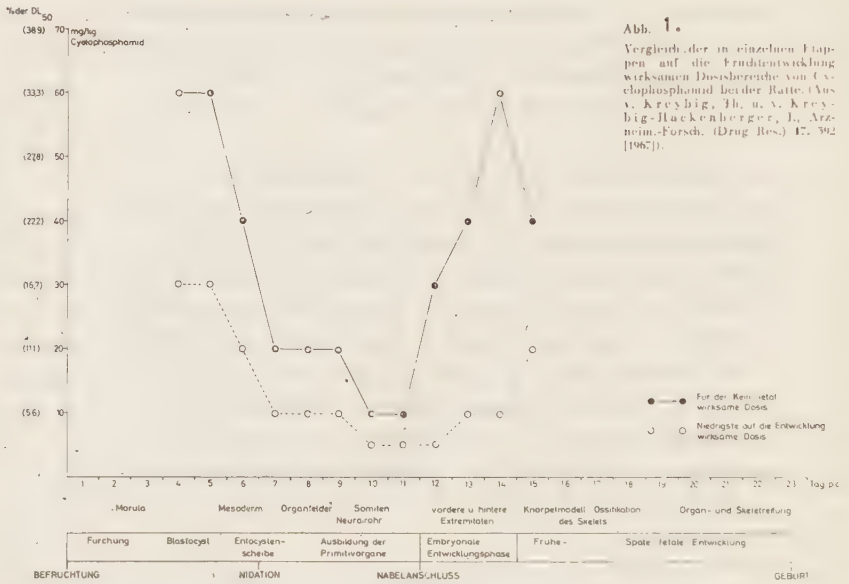


Abb. 1.

Vergleich der in einzelnen Stadien auf die Fröhenwicklung wirksamen Dosisbereiche von Cyclophosphamid bei der Ratte. (Aus v. Kreybig, Th. u. v. Kreybig-Ilckenberger, L., Arzneimittel-Forsch. (Drug Res.) 17: 392 [1967]).

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

=====

- BECKER, B.A.: Effects of metabolic inducers and inhibitors on drug-induced teratology in mice.
Fourth International Congress on Pharmacology 1969, Basel, Abstracts, 496
- BROCK, N.,
HOHORST, H.-J.: Metabolism of cyclophosphamide
Cancer 20, 900 (1967)
- CHAUBE, S., KURY, G.,
MURPHY, M.L.: Teratogenic effects of cyclophosphamide (NSC-26271) in the rat.
Canc. Chemother. Rep., 51, 363 - 371 (1967)
- ENGELS, K., KROWKE, R.,
NEUBERT, D.: Vergleichende Untersuchungen über die Alkylierung von embryonalem und mütterlichem Gewebe durch Cyclophosphamid.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 260, 110 (1968)
- ENGELS, K.: Dissertation, Freie Universität Berlin, (1972)
- FRITZ, H., HESS, R.: Ossification of the rat and mouse skeleton in the perinatal period.
Teratology 3, 331 - 337, (1970)
- VON KREYBIG, Th.: Die teratogene Wirkung von Cyclophosphamid während der embryonalen Entwicklungsphase bei der Ratte
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 252, 173 - 195 (1965)
- VON KREYBIG, Th.: Experimentelle Praenatal-Toxikologie
Aulendorf 1968

- LORKE, D.: Embryotoxische Wirkungen an der Ratte
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 250, 360 - 382 (1965)
- MURPHY, L.: Factors influencing teratogenic response to drugs
Teratology, Principles and Techniques, The University of Chicago Press, Chicago, London (1965)
- NEUBERT, D.: Zur Wirkungsweise von Cytostatica
Verhandlungsbericht der Deutschen Gesellschaft für Urologie Berlin-Heidelberg-New York (1968) 137 - 153
- NEUBERT, D.: Beeinflußung des Nucleinsäure- und Proteinstoffwechsels durch Pharmaka
Der Internist, August 1966, 435 - 454
- PÄTAU, K.: Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen
Biologisches Zentralblatt, 63, 152 - 163, (1943)
- PALME et LISS: Aus: VON KREYBIG, Th. Experimentelle Praenatal-Toxikologie, Aulendorf (1968)
- TUCHMANN-DUPLESSIS, H.: Pure and Applied Chemistry, 19, 1969
- TUCHMANN-DUPLESSIS, H.,
MERCIER-PAROT, L.: Dissociation des proprietes anti-tumorales et teratogenes d'un antimetabolite des purines, l'azathioprine.
Comptes rendus des seances de la Societe de Biologie
Extrait du Tome 159, No. 12, 2290 (1965)
- TUCHMANN-DUPLESSIS, H.,
MERCIER-PAROT, L.: Reactions provoquées chez l'embryon par deux antimetabolites chimiquement voisins.
Bulletin de l'Academie Suisse des Sciences Medicales, Vol. 22, 153-165 (1966)

- TUCHMANN-DUPLESSIS, H.: Reactions of the Foetus to Drugs
Taken by the Mother
Ciba Foundation Symposium
245 - 266 (1969)
- WHEELER, G.P.: Some Biochemical Effects of Alkyl-
ating Agents .
Federation Proceedings 26, 885
(1967)
- WILSON, J.: Teratogenic interaction of chemi-
cal agents in the rat
J. Pharm. exp. Ther., 144, 429
(1964)

LEBENS LAUF

=====

Geboren am 7. Oktober 1941 in Bad Freienwalde / Oder.

Eingeschult 1948 in Bad Freienwalde. Dort auch das Abitur
1960 bestanden an der erweiterten polytechnischen Oberschule.

Zwei Semester Theologiestudium an der Humboldt-Universität
zu Berlin.

Im April 1962 Anerkennungsprüfung des Abiturs in Uelzen /Hann.
bestanden. Ein halbes Jahr als Kindergarten-Helferin in einem
Kinderheim in Berlin gearbeitet, um das Sozialpädagogische
Institut der Arbeiter-Wohlfahrt in Berlin besuchen zu kön-
nen. Fortsetzung des Studiums der Sozialpädagogik an der
Freien Universität Berlin im Sommersemester 1963.

Medizinstudium ab Wintersemester 1963/64 in Berlin, Freiburg
und Göttingen. Ärztliche Prüfung im Februar 1971 bestanden.

Der χ^2 -Test wurde nach folgender Formel durchgeführt:

- a = Gruppe 1.) - beeinflusste Feten
- b = Gruppe 1.) - nicht beeinflusste Feten
- c = Gruppe 2.) - beeinflusste Feten
- d = Gruppe 2.) - nicht beeinflusste Feten

N = Gesamtzahl der Feten in beiden Gruppen

$$\chi^2 = \frac{\{(ad - bc) - 1/2N\}^2 \cdot N}{(a + b) \cdot (c + d) \cdot (a + c) \cdot (b + d)}$$

Freiheitsgrad = 1



Bild 1

Skelett eines Ratten-
fetus der Kontrollgruppe.
Tag 21+0 der Gestation.
Stamm Wistar SW 64.

Bild 2

Kopf eines Rattenfetus
der Kontrollgruppe.
Tag 21+0 der Gestation.
Stamm Wistar SW 64.





Bild 3

Rattenfetus am Tag 21+0
der Gestation.

5 mg/kg Cyclophosphamid
i.p. appliziert am
Tag 12+0 der Gestation.
Stamm Wistar SW 64.

Die Wirbelkörper sind
nantelförmig und
gespalten.

Deformation der Wirbelsäule
durch zwei Zwischenwirbel-
körper allein bei diesem
Fetus aufgetreten.

Bild 4

Rattenfetus am Tag 21+0
der Gestation.

6 mg/kg Cyclophosphamid
i.p. appliziert am
Tag 12+0 der Gestation.
Stamm Wistar SW 69.

Das Os interparietale
ist verkleinert, das Os
supraoccipitale fehlt.

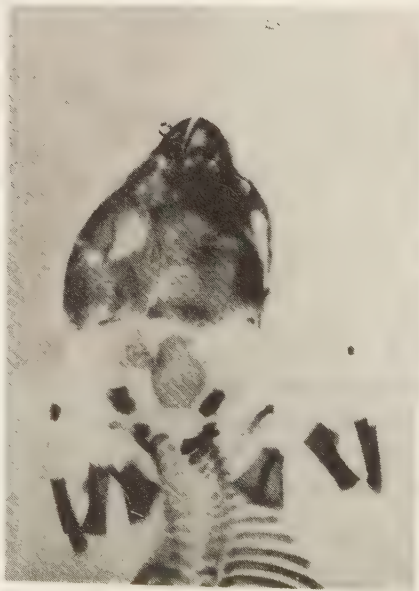




Bild 5

Rattenfetus am Tag 21+0
der Gestation.

15 mg/kg Azathioprin oral
appliziert am Tage 11-14.
Stamm Wistar SW 64.

Bei diesem Fetus ist die
fehlende Verknöcherung des
Os interparietale und die
Verkleinerung des Os
supraoccipitale auffallend.

Bild 6

Rattenfetus am Tag 21+0
der Gestation.

15 mg/kg Azathioprin oral
appliziert am Tage 11-14.
Stamm Wistar SW 64.

Os interparietale und
Os supraoccipitale sind
verkleinert.





Bild 7

Rattenfetus am Tag 21+0
der Gestation.

15 mg/kg Azathioprin
am Tag 11-14 der Gestation
und zusätzlich

6 mg/kg Cyclophosphamid
am Tag 12 der Gestation
appliziert.

Stamm Wistar SW 64.

Einige Schädelknochen
fehlen.

Bild 8

Rattenfetus am Tag 21+0
der Gestation.

15 mg/kg Azathioprin
am Tag 11-14 der Gestation
und zusätzlich

6 mg/kg Cyclophosphamid
am Tag 12 der Gestation
appliziert.

Stamm Wistar SW 64.

Gespaltene Wirbelkörper.



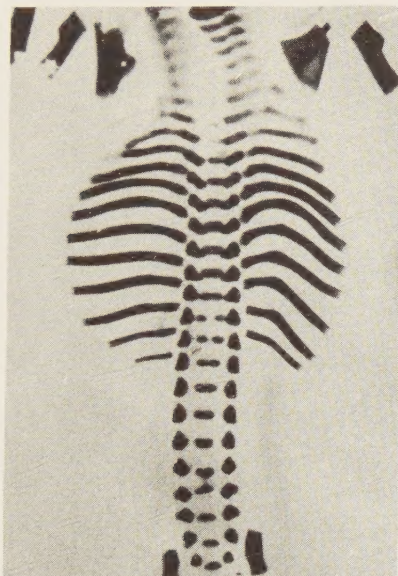


Bild 9

Rattenfetus am Tag 21+0 der Gestation.
6 mg/kg Cyclophosphamid i.p. appliziert
am Tag 11 der Gestation. Stamm Wistar SW 64.
Gespaltene Wirbelkörper. Die 13. Rippe
rechts fehlt.
Zusammengewachsene Wirbelkörper wurden nur
in dieser Versuchsgruppe gefunden.

